

文章编号: 1673 1689(2010)05-0715-06

绿豆蛋白多肽对小鼠缺氧耐受力 and 免疫力提高的研究

郭 健, 李延平
(广东医学院, 广东 湛江 524023)

摘 要: 研究绿豆蛋白多肽(Mung bean protein, peptide MBPP)提高小鼠缺氧耐受力和免疫力的作用。采用高压凝胶色谱法测定 MBPP 均重分子量(M_w);并将小鼠分成 3 组连续灌胃给药 30 d 后,分别进行常压耐缺氧、亚硝酸钠中毒存活、和急性耐缺氧试验;采用 ConA 诱导小鼠淋巴细胞转化实验(MTT 法)及迟发性变态反应(DTH)、抗体生成细胞(PFC)检测及半数溶血值(HC50)实验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验,检测绿豆蛋白多肽对小鼠免疫功能的影响;其结果:绿豆蛋白多肽的 M_w 为 195~1 000, 其中 195~510 组分占 70.2% 以上;绿豆蛋白多肽 0.82 g/kg·BW 和 1.23 g/kg·BW 剂量组能明显延长小鼠常压缺氧存活时间($P < 0.05$)和延长亚硝酸盐中毒后小鼠存活时间($P < 0.05$);绿豆蛋白多肽能提高小鼠的淋巴细胞增值力、脾脏生成抗体细胞数、半数溶血值及巨噬细胞吞噬能力,绿豆蛋白多肽能提高小鼠缺氧耐受力和免疫力。

关键词: 绿豆蛋白多肽;缺氧耐受力;免疫力

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

Study of MBPP on Anoxia Endurance and Enhancing Immunity

GUO Jian, LI Yanping
(Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: To investigate the anoxia endurance and immunological of mung bean protein or peptide (MBPP) in mice. This research employs high performance gel permeation Chromatography (HPGPC) to investigate and evaluate the molecular weight's (M_w) distribution of MBPP. The tested mice were randomly distributed into 3 groups, and were continuously given MBPP by intragastric administration for 30 days, then the living time of mice were measured in anoxia with normal air pressure, in poisoning by nitrite poisoning and in acute lack of blood in brain. The effect was evaluated on cellular immunity by ConA lymphocyte transformation test (MTT) and delayed type hypersensitivity (DTH). The impact of humoral immunity was detected by antibody-producing cells (PFC) test and the value of half of hemolysis (HC50) in mice. The non-specific immunity was detected by abdomen macrophages of mice devour chicken red cell test. The M_w MBPP is between 195~1000D, in which the component of 195~510D takes 70.2% or above. MBPP of 0.82 g/kg·BW and 1.23 g/kg·BW dose group could significantly prolong the living time of mice with hypoxia ($P < 0.05$) and long-nitrite poisoning in mice living time

收稿日期: 2009-11-03

基金项目: 广东省科技厅社会发展重点计划项目(2008B030301015)。

作者简介: 郭健(1981-)女,黑龙江牡丹江人,医学硕士,主要从事蛋白质多肽抗衰老机制研究。Email: guoshuaihuai001@sohu.com

($P < 0.05$). Compared with that of the control group, MBPP could promote DTH, PFC, HC50 and Macrophage phagocytosis ability in mice. MBPP could improve the anoxia endurance and immunological in mice.

Key words: mung bean protein or peptide(MBPP), Anoxia Endurance, Enhancing immunity

绿豆中蛋白质含量丰富, 含有各种氨基酸、各种维生素(硫胺素、核黄素、尼克酸、维生素 E 等)和微量元素(钾、钠、钙、镁、铁、锰、硒等)。以绿豆为原料采用酶解工艺, 制备低分子量绿豆蛋白多肽(MBPP)经 G2000S 凝胶层析, 得到单一的层析峰, 其相对分子质量分布 195~510, 具有生物活性高, 提高缺氧耐受力、改善缺氧状况及增强免疫力的特点。绿豆蛋白多肽增强免疫力的功能未见国内报道。本文重点研究绿豆蛋白多肽相对分子质量的分布、提高小鼠缺氧耐受力和增强免疫力的功效作用。为研制绿豆蛋白多肽提高缺氧耐受力和增强免疫力的新型保健食品提供理论依据。

1 材 料

1.1 供试品与试剂

绿豆蛋白多肽胶囊是以绿豆蛋白多肽为主要原料: 由作者所在实验室自制, 批号: 080509, 0.42 g/粒, 蛋白多肽质量分数 $\geq 10\%$, 临用前将胶囊内容物用蒸馏水配制并定容至 0.205、0.410、0.615 mL。多肽相对分子质量对照品: 细胞色素 C(cytochrome, 12 500.0)、抑肽酶(aprotinin, 6 500.0)、杆菌肽(bactitracin, 1 450.0)、乙氨酸-乙氨酸-络氨酸-精氨酸(M_w 451.5)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(M_w 189.2)纯度: $\geq 98.5\%$, 刀豆蛋白 A(ConA), ; 四甲基偶氮唑盐 [MTT 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide], PPM F1640 培养液、Hank's 液, 以上试剂均为 Sigma 公司产品。

1.2 动物

SPF 级 BALB/C 小鼠, 雌性, 体重(18~22) g, 许可证编号 SCXK(粤)2008-00008, 2008A040。SPF 级 KM 小鼠, 雌性, 体重(18~22) g, 许可证号: SLXK(粤)2008-0008, 2008A037, 以上动物均由广东医学院实验动物中心提供。

1.3 仪器

LCMS-8000 a 型高效液相色谱-质谱联用仪, UV-3101PC 紫外-可见-近红外扫描分光光度计, 岛津(日本), ELX800 酶标仪(美国), NAPCO CO₂ 培养箱(美国), Milli-Q A10(超纯水器(Millipore Inc, 美国)), METTLER240 电子分析天平, 秒表。

2 实验方法

2.1 分子量分布

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 TSKgel G2000S WXL(300 mm $\times$ 7.8 mm), 流动相: 乙腈: 水: 三氟醋酸 = 30: 70: 0.1(体积比), 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长: UV214 nm, 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积: 10 μL 。

2.1.2 标准曲线 取已知相对分子质量为 12 500.0、6 500.0、1 450.0、451.0、189.2 的 5 种多肽对照品, 用 0.05% 叠氮化钠溶液制成 0.5 mg/mL 的溶液, 进样 10 μL , 记录色谱图, 绘制标准曲线。

2.1.3 测定 MBPP 相对分子质量分布 制备测定液: 精密 MBPP 粉末 20 g, 置于离心管中, 加入超纯水 10 mL, 超声处理 20 min, 离心, 3 000 r/min, 10 min, 分离上清液, 残渣加入超纯水 5 mL, 超声, 离心同前。合并上清液, 采用 0.22 μm 滤膜过滤至 50 mL 容量瓶中, 至刻度, 混匀。根据 lowry 法蛋白定量结果, 稀释成 1 mg/mL, 取 10 μL 进样。

2.1.4 相对分子质量分布计算方法 根据 LCMS-8000a 数据处理系统, 将样品的色谱数据代入校正曲线方程中计算, 即得绿豆蛋白多肽分子量及其分布范围。用峰面积归一法计算得出不同分子量范围的相对百分比。

2.2 提高缺氧耐受力试验

2.2.1 动物分组及给药剂量 实验动物: BALB/C 小鼠, 分为耐缺氧组 I: 小鼠常压缺氧实验组; 缺氧组 II: 硝酸盐中毒小鼠存活实验组; 耐缺氧组 III 急性脑缺血性缺氧实验组。给药剂量: 绿豆蛋白多肽胶囊成人(按 60 kg 计算)推荐用量为 2.46/60 kg/d, 即 0.041 g/kg $\cdot$ BW。小鼠给药按人体推荐用量 5、10、30 倍, 分别设 0.205、0.410、1.230/kg $\cdot$ BW 3 个剂量组, 和溶剂对照组。

2.2.2 给药方法 每一实验组小鼠按体重随机分为 4 组, 每组 10 只, 按高、中、低剂量组灌胃(BW)给药, 0.2 mL/10 g $\cdot$ BW, 对照组给予相同体积的蒸馏水, 连续给药 30 天, 进行小鼠常压缺氧、硝酸盐中毒、急性脑缺血性缺氧实验^[1]。

2.2.3 检测指标 MBPP 相对分子质量分布及标

准工作曲线;小鼠常压缺氧死亡时间(min)、硝酸盐中毒小鼠存活时间(min)、急性脑缺血性缺氧记录小鼠断头后至张口喘气停止时间(S)。

2.3 增强免疫力试验

2.3.1 动物分组及给药剂量 实验动物: SPF 级 KM 小鼠,随机分为 6 大组(①ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化、②抗体生成细胞检测、③二硝基氟苯(DNFB)耳肿胀法诱发小鼠迟发型变态反应(DTH)、④小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞、⑤血清溶血素的测定、⑥NK 细胞活性测定),每组 40 只,每大组内分为溶剂对照组和绿豆蛋白多肽(MBPP)高、中、低剂量组,给药剂量和方法同提高缺氧耐受力试验。

2.3.2 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验(MTT)[1]。

2.3.3 抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法)见参考文献[1]。

2.3.4 二硝基氟苯(DNFB)耳肿胀法诱发小鼠迟发型变态反应(DTH)试验 参考见文献[1]。

2.3.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(滴片法) 见参考文献[1]。

2.3.6 血清溶血素的测定(血凝法) 见参考文献[1]。

2.3.7 NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶 LDH 测定法) 见参考文献[1]。

2.4 数据统计 采用 SPSS11 软件进行单因素的方差分析

3 结 果

3.1 MBPP 相对分子质量分布

相对分子质量为 195~ 1 000,其中 195~ 510 D 组分占 70.2% 以上。相对分子质量分布校正标准工作曲线见表 1,根据校正曲线方程

$$\lg M_w = -0.62811X t_R + 8.7848,$$
$$Y = -0.99972$$

表 1 分子量分布校正标准工作曲线
Tab. 1 Molecular weight distribution calibration standard curve

M_w	$\lg M_w$	t_R / min
125 00	4.096 9	6.336
6 500	3.813	7.912
1 450	3.610	8.975
451.5	2.655	9.726
189.2	2.277	10.376

计算样品相对分子质量分布范围,用峰面积归一法计算相对分子质量范围的百分比,195~ 510 占 70.2%。标准工作曲线色谱见图 1,MBPP 色谱见图 2,由图 2 所见 MBPP 为单峰。

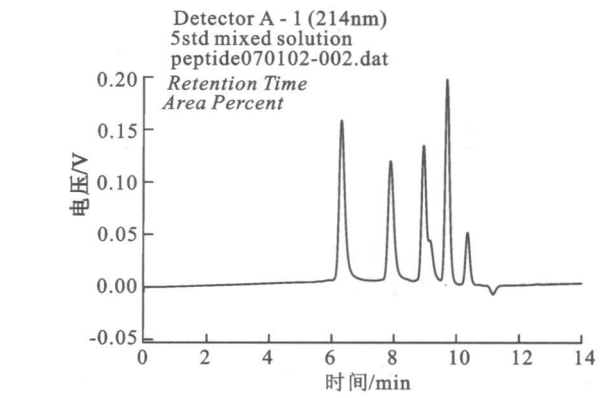


图 1 标准分子量分布
Fig. 1 Standard chromatograms of molecular weight distribution

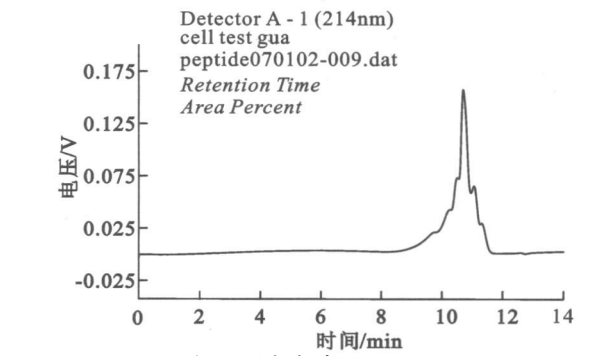


图 2 绿豆蛋白多肽(t_R 9.898 min)
Fig. 2 chromatogram of MBPP(t_R 9.898 min)

3.2 MBPP 提高缺氧耐受力的实验结果

1) 常压耐缺氧见表 2。MBPP 高剂量和中剂量组明显延长缺氧存活时间。

2) 亚硝酸钠中毒见表 3。高剂量和中剂量组明显延长亚硝酸钠中毒存活时间。

3) 急性脑缺血性缺氧见表 4。高剂量和中剂量组明显延长急性脑缺血性缺氧存活时间。

3.3 MBPP 增强免疫力的实验结果

3.3.1 MBPP 对小鼠脾淋巴细胞转化和抗体生成细胞的影响见表 5。3 个剂量组均能增强淋巴细胞增值力和增加溶血空斑数,但存在剂量依赖关系。

3.3.2 绿豆蛋白多肽对小鼠迟发性变态反应和巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响见表 6。高剂量和中剂量组明显增加耳片重量差值(mg^{-1})、吞噬率(%)和吞噬指数。

3.3.3 绿豆蛋白多肽对小鼠血清溶血素和 NK 细

胞活性的影响见表 7。高剂量和中剂量组明显增加半数溶血值(H C50)和 NK 细胞活性(%)

表 2 绿豆蛋白多肽对小鼠常压耐缺氧实验结果($\bar{x}\pm S$, $n= 10$)

Tab.2 Results on Atmospheric hypoxia tolerance of MBPP in mice

组 别	剂 量/(g/ kg)	体重/g	缺氧存活时间/min	
			0 d	30 d
溶剂对照		19.1±0.8	29.8±1.5	23.18
低 剂 量	0.205	19.0±1.0	30.1±2.1	25.37
中 剂 量	0.410	19.2±0.9	30.4±1.9	26.13±3.32*
高 剂 量	1.230	19.3±0.9	29.7±1.8	27.15±4.40**

* 与溶剂对照组比较 $P< 0.05$, ** 与溶剂对照组比较 $P< 0.01$

表 3 绿豆蛋白多肽对小鼠亚硝酸钠中毒实验结果 ($\bar{x}\pm S$, $n= 10$)

Tab.4 Results on sodium nitrite poisoning of MBPP in mice

组 别	剂 量/(g/ kg)	体重/g	缺氧存活时间/min	
			0 d	30 d
溶剂对照		19.0±0.9	30.2±1.6	20.10±1.90
低 剂 量	0.205	19.1±1.1	30.6±2.1	22.40±1.12
中 剂 量	0.410	19.3±1.0	30.4±1.9	23.30±2.06*
高 剂 量	1.230	19.3±1.5	30.7±1.8	23.90±1.40**

* 与溶剂对照组比较 $P< 0.05$, ** 与溶剂对照组比较 $P< 0.01$

表 4 绿豆蛋白多肽对小鼠急性脑缺氧试验结果($\bar{x}\pm S$, $n= 10$)

Tab.4 Results on acute cerebral ischemia of MBPP in mice

组 别	剂 量/(g/ kg)	体重/g	缺氧存活时间/min	
			0 d	30 d
溶剂对照		19.2±0.9	29.9±1.3	16.20±1.37
低 剂 量	0.205	19.0±1.0	29.6±2.4	16.82±2.04
中 剂 量	0.410	19.4±1.1	30.4±1.9	18.55±3.09*
高 剂 量	1.230	19.2±1.2	30.7±1.8	19.70±2.12*

* 与溶剂对照组比较 $P< 0.05$

表 5 绿豆蛋白多肽对小鼠脾淋巴细胞转化和抗体生成细胞的影响($\bar{x}\pm S$, $n= 10$)

Tab.5 Effect of MBPP on spleen lymphocyte transformation and antibody producing cells in mice

组别	剂量(g/ kg)	淋巴细胞增值力(OD 差值)	溶血空斑数(个/ 10^6 脾细胞)
溶剂对照		0.21±0.08	244±51
低剂量	0.205	0.24±0.10*	265±48*
中剂量	0.410	0.31±0.09**	277±47**
高剂量	1.230	0.45±0.12**	316±56**

* 与溶剂对照组比较 $P< 0.01$

表 6 绿豆蛋白多肽对小鼠迟发性变态反应和巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响($\bar{x}\pm S$, $n=10$)

Tab. 6 Effect of MBPP with delayed hypersensitivity and macrophage phagocytosis of chicken erythrocytes in mice				
组别	剂量(g/ kg)	耳片重量差值(mg^{-1})	吞噬率(%)	吞噬指数
溶剂对照		9.0 $\pm$ 0.9	27.5 $\pm$ 4.8	0.97 $\pm$ 0.13
低剂量	0.205	9.5 $\pm$ 2.4	28.2 $\pm$ 3.5	1.04 $\pm$ 0.15
中剂量	0.410	10.8 $\pm$ 3.5*	30.4 $\pm$ 3.1*	1.23 $\pm$ 0.14*
高剂量	1.230	12.4 $\pm$ 2.8*	32.3 $\pm$ 4.3*	1.29 $\pm$ 0.18*

* 与溶剂对照组比较 $P<0.05$

表 7 绿豆蛋白多肽对小鼠血清溶血素和 NK 细胞活性的影响($\bar{x}\pm S$, $n=10$)

Tab. 7 Effect of MBPP on serum hemolysin and NK cell activity in mice			
组别	剂量(g/ kg)	半数溶血值(HC50)	NK 细胞活性(%)
溶剂对照		101.1 $\pm$ 15.2	18.9 $\pm$ 7.9
低剂量	0.205	107.3 $\pm$ 14.7	20.4 $\pm$ 8.2
中剂量	0.410	114.2 $\pm$ 13.8*	22.7 $\pm$ 9.4*
高剂量	1.230	118.5 $\pm$ 15.5*	25.6 $\pm$ 7.7*

* 与溶剂对照组比较 $P<0.05$

4 讨 论

绿豆为药食两用的豆科植物种子。每 100 g 绿豆中含有 22.1 g 蛋白质, 主要是球蛋白, 其氨基酸的组成有蛋氨酸、色氨酸、酪氨酸和精氨酸^[2]。绿豆蛋白多肽不仅能提高缺氧耐受力^[3-4], 还能提高人体的免疫力^[5-7]。本实验采用低温酶解法^[8-9]制备相对分子质量为 195~1 000 的低相对分子质量多肽, 具有提高小鼠缺氧耐受力功能。实验结果表明: MBPP 小鼠常压耐缺氧和硝酸钠中毒试验中、高剂量组显著延长常压耐缺氧和硝酸钠中毒的存活时间; MBPP 小鼠急性脑缺氧试验结果表明: 中、高剂量组喘气时间延长。以上实验结果说明 MBPP 对脑缺氧或心肌缺氧有一定的改善作用, 并提示 MBPP 具有延长小鼠脑缺血性缺氧喘气时间作用。

绿豆蛋白多肽对小鼠脾淋巴细胞转化和抗体生成细胞的实验结果表明: 淋巴细胞增值力和溶血空斑数/(个/10⁶脾细胞)实验组均高于溶剂对照组。T 淋巴细胞在体外经过植物血凝素的刺激后, 可以转化为淋巴母细胞, 根据淋巴细胞的转化情况, 反应身体的细胞免疫的水平。淋巴细胞增值力增强,

则说明细胞免疫的水平增强; 抗体生成细胞可产生 IgM, 是判断肌体免疫功能的指标, 溶血空斑数/(个/10⁶脾细胞)增多说明免疫力增强;

绿豆蛋白多肽对小鼠迟发性变态反应和巨噬细胞吞噬鸡红细胞的实验结果表明: 耳片重量差值、吞噬率和吞噬指数中、高剂量组均高于溶剂对照组。迟发性变态反应是由致敏 T 细胞与相应抗原结合而引起的, 以单核细胞浸润和细胞变性坏死为特征的局部变态反应性炎症。该类反应发生较迟缓, 一般需经 48~72 h, 是反映肌体特异性细胞免疫功能指标; 巨噬细胞是一种非特异性免疫细胞, 能吞噬和消灭外来异物和自身死亡细胞; 耳片重量差值、吞噬率和吞噬指数增高均说明免疫功能增强;

绿豆蛋白多肽对小鼠血清溶血素(IgM) 和 NK 细胞活性的实验结果表明: 半数溶血值和 NK 细胞活性(%), 中、高剂量组均高于溶剂对照组。NK 细胞是天然杀伤细胞, 其活性增高, 说明免疫力增强。

通过 MBPP 提高小鼠缺氧耐受力和增强免疫功能的实验研究, 证明 MBPP 具有提高缺氧耐受力和增强免疫力的功能, 此实验结果为研制绿豆蛋白多肽能新型保健食品提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] 中华人民共和国卫生部卫生法制与监督司主编. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 北京. 中华人民共和国卫生部, 2003. 22– 34. 94.
- [2] 汪少芸, 叶秀云, 饶平凡. 绿豆生物活性物质及功能的研究进展[J]. 中国食品学报, 2004, 4(1): 98– 101.
- WANG Shaoyun, YE Xiur yun, RAO Ping fan. Research progress on the biological activities and functions of mung beans [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2004, 4(1): 98– 101. (in Chinese)
- [3] 张竞竞, 易建勇, 王宝钢等. 绿豆皮抗氧化物质的提取及初步分析[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 64– 6.
- ZHANG Jing jing, YI Jian yong, WANG Bao gang, et al. Extraction and analysis of antioxidants in mung bean hull[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(12): 64– 6. (in Chinese)
- [4] Del Campilo, Leland M, Shannon L M. Molecular properties of the enzymic phytohemagglutinin of mung bean [J]. **J Biol Chem**, 1981, 256: 7177– 7180.
- [5] Yamaoka Y, M Takuchi, Y. Purification and characterization of cyteine endoprotease in cotyledons of germinated mung bean seeds[J]. **Plant Phsiol**, 1990, 94: 561– 566.
- [6] 程霜, 杜凌云, 王勇, 等. 绿豆皮中抗氧化剂的初步研究[J]. 中国粮油学报, 2000, 15(2) : 39– 43.
- CHENG Shuang, DU Ling yun, WANG Yong, et al. Primary study on antioxidants in mungbean skin[J]. **Journal of the Chinese cereals and oils association**, 2000, 15(2) : 39– 43. (in Chinese)
- [7] 钟晓芝. 绿豆对小鼠红细胞免疫粘附功能的影响[J]. 浙江中医杂志, 2000, 35(6): 258– 259.
- ZHONG Xiaozhi . Effets on on red cell immune adherence function by mung bean[J]. **Zhejiang Journal of traditional Chinese Medicine**, 2000, 35(6): 258– 259. (in Chinese)
- [8] 屠春燕, 袁艳娟, 徐娟, 等. 碱性蛋白酶酶解绿豆分离蛋白制备小分子肽的工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2) : 23– 27.
- TU Chur yan, YUAN Yair juan, XU Juan, et al. Study of preparing small peptides by hydrolyzing isolate mung bean protein with alcalase proteinase[J]. **Food Research and Development**, 2009, 30(2): 23– 27. (in Chinese)
- [9] 谢正军, 金征宇, 徐学明, 等. 苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 627– 632.
- XIE Zheng jun, JIN Zheng yu, XU Xue ming. Comparison of antioxidant activities of alfalfa leaf protein and its hydrolysat es[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 627– 632. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)